 doi 10.3969/j.issn.1674-4500.2017.01.21

基础研究

水通道蛋白4在大鼠脑缺血再灌注后脑水肿中的变化及意义

廖建坤,何玉华,陈亚平
武警广东省总队医院番禺院区急诊科,广东 广州 511430

摘要:目的 基于大鼠局灶性脑损伤缺血再灌注模型,观察水通道蛋白4(AQP4)、蛋白激酶C(PKC)的表达水平变化与脑水肿的关系。**方法** 线栓法复制大脑中动脉缺血再灌注模型,大鼠随机分为正常对照组、假手术组和缺血再灌注(CIR)组。通过绿色荧光蛋白GFP标识的AQP4示踪系统评价大鼠星形胶质细胞的水通透性,同时检测脑组织含水量和进行神经功能缺损评分。AQP4和PKC的表达使用免疫组织化学方法检测。**结果** CIR后6 h大鼠开始出现神经功能缺损,脑组织含水量在CIR 12 h明显升高,24 h~3 d时达到高峰;AQP4表达在早期水平降低,从12 h逐渐升高,至CIR 24 h明显升高,3 d达高峰;PKC在CIR 6 h后缓慢增加,连续5 d维持较高水平。**结论** 脑水肿可能和PKC、AQP4的升高相关,PKC可能在CIR早期通过磷酸化AQP4以降低AQP4的表达以延缓脑水肿进程。
关键词:水通道蛋白4;蛋白激酶C;水通透性;脑水肿

Change of aquaporin-4 in brain edema after cerebral ischemia reperfusion in rats

LIAO Jiankun, HE Yuhua, CHEN Yaping
Department of emergency, Armed Police Corps Hospital of Guangdong, Guangzhou 511430, China

Abstract: Objective To explore the relationship between expression level of aquaporin-4 (AQP4), protein kinase C (PKC) and brain edema based on the focal cerebral ischemia reperfusion rat model. **Methods** The rat model of middle cerebral artery (MCA) was duplicated by suture method .The rats were randomly divided into normal control group, sham-operated group and cerebral ischemia reperfusion(CIR) group. Water permeability for rat astrocytes was evaluated by the green fluorescent protein(GFP) labeled AQP4 tracing system. Scores of neurofunctional defect were graded and water content in brain tissues was measured. Expression of AQP4 and PKC in brain tissue was detected by immunohistochemistry. **Results** Neurofunctional defect occurred at 6 h after CIR. Water content in brain tissue increased at 12 h after CIR, reached peak at day 1-3. The expression levels of AQP4 were decreased first, then increased gradually at 12 h later, obviously increased at 24 h after CIR and reached to highest point at day 3. While PKC increased gradually at 6 h after CIR, kept high level for 5 days. **Conclusion** Brain edema may relate to the rise of PKC and AQP4, PKC may reduce the expression of AQP4 via phosphorylation in the early stage of CIR in order to delay the process of brain edema.
Key words: aquaporin4; protein kinase C; water permeability; brain edema

外伤性脑水肿通常继发于脑挫裂伤,脑出血病灶之中,同时也是造成颅内高压、脑疝以及创伤伤残的主要原因,如何减轻该情况的发生,一直是神经外科、急诊科的研究方向。颅脑损伤后脑水肿的形成有多种细胞信号参与[1-5],这些细胞信号之间的关联研究是当前国内外的热点和难点。已有研究表明水通道蛋白4(AQP4)、蛋白激酶C(PKC)与脑水肿关系密切[6-9]。但PKC与AQP4在脑水肿变化各个阶段的关联研究鲜见文献报道。本实验通过观察大鼠大脑中动脉缺血再灌注(MCAO/R)模型AQP4、PKC的不同时相动态变化与脑水肿的关系,进一步阐明AQP4在脑水肿发生发展中的作用及其机理,为今后颅脑损伤的治疗提供理论依据。

收稿日期:2016-08-16
基金项目:广东省医学科研基金(A20124521)
作者简介:廖建坤,硕士,副主任医师,E-mail: liaofang_1997@126.com

1 资料与方法

1.1 实验对象

大鼠144只(南方医科大学实验动物养殖中心提供),鼠龄,4~5个月,体质量300~330 g,等级:cl,出现的死亡及神经功能评分未达要求者由备用组补充,实验动物随机对照分为3组:正常对照组、假手术组、缺血再灌注(CIR)组。缺血再灌注组分别在6、12 h、1、3、5 d给予免疫组织化学染色及脑组织含水量检测,每时间点12只大鼠;正常对照组和假手术组每6只大鼠亦分别给予免疫组织化学染色及脑组织含水量测量。

1.2 试剂和仪器

国产手术显微镜与光学显微镜、80~100 ℃干燥箱、免抗鼠单克隆体PKC、生物素化二抗、SABC免疫组化试剂盒。钙黄绿素-AM、pMD®20-T Vector、特异性PCR引物、硅胶模型™质粒DNA小量提取试剂盒。

1.3 方法

线栓法制作大鼠大脑MCAO/R模型，缺血2 h后再灌注。假手术组实施相同手术，线栓置入深度<10 mm。神经功能评分采用Garcia JH法[10]，依照Elliot公式计算脑组织含水量。SABC行免疫组化染色用于检测PKC、AQP4的表达水平。以GFP-C1-AQP4-M23的CTX-TNA2细胞为观察对象，记录GFP荧光图像并进行图像重建，了解AQP4在星形胶质细胞膜上的分布。试验数据采用统计分析软件SPSS 19.0分析并进行统计学处理，多组均数间比较用q检验，双变量关系用相关分析，以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

分析3组观察指标AQP4、PKC、脑含水量及神经功能缺损评分情况（表1），因对照组组与假手术组在6、12 h、1、3、5 d这5个时间节点的数据差异无统计学意义，故只选择6 h这一时间节点值与CIR组进行比较。

表1 3组各观察指标的变化($\bar{x}\pm s$)

分组	例数(n)	AQP4	PKC	脑含水量(%)	神经功能缺损评分
CIR组6 h	24	2.90±0.55*	5.49±0.53*	79.12±0.31	10.92±0.72*
CIR组12 h	24	4.30±0.53	5.51±0.45*	80.16±0.21*	10.21±0.77*
CIR组24 h	24	5.30±0.52*	5.95±0.81*	82.59±0.78*	9.19±2.16*
CIR组3 d	24	6.30±0.53*	6.21±0.85*	82.87±0.56*	8.12±2.11*
CIR组5 d	24	6.17±0.42*	6.42±0.53*	83.15±0.72*	10.29±1.11*
对照组	12	3.89±0.12	4.10±0.02	77.98±0.48	18.32±0.13
假手术组	12	3.62±0.53	3.65±0.59	77.69±0.53	17.65±0.54
F		21.5	32.4	18.3	85.7
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.01

*P<0.05 *vs* 对照组.

3 讨论

缺血致脑水肿的发病机理十分复杂，AQP4、PKC等细胞信号在脑缺血再灌注不同阶段的表达升高与脑水肿形成有关。大脑星形胶质细胞的关键作用是调节脑内水平衡[11-13]，可能是表达于星形胶质细胞的AQP4因其水通透性改变而释放入脑组织，水通过AQP的转运快速入脑。AQP4在中枢广泛分布，与中枢水代谢的调节密切相关，参与脑损伤等继发脑水肿的形成过程[14]。本研究中CIR组除6 h检测AQP4含量显著低于正常对照组和假手术组外，其余12、24 h、3、5 d这4个时间节点AQP4的含量均高于对照组，3 d达到峰值，5 d下降不多。分析其原因，可能是缺血再灌注造成了大鼠大脑的持续性损伤，这种损伤随时间的延续有加重的倾向。

PKC的表达变化情况也和AQP4相似，6、12、24 h、3、5 d这5个时间节点的含量持续且明显增加，到第5天达到最高水平。与此情况相似的还有神经功能缺损评分，在相同的时间节点评分持续且明显增加，说明神经功能缺损5 d达到高峰。AQP4、PKC和神经功能缺损评分的同向增加是否说明AQP4与PKC在脑水肿中具有叠加效应尚不得而知。AQP4与PKC之间可能存在的关联也不清楚。有关研究表明：PKC可使AQP4磷酸化以达到调节AQP4活性的目的[15]。Manley[12]发现，培养的大鼠星形胶质细胞敲除AQP4基因后水的通透性比正常星形胶质细胞水通透性降低了7.1倍，本实验早期也发现AQP4明显低于正常对照组。鉴于PKC可使AQP4磷酸化而失活，早期AQP4水平降低可能表明PKC对AQP4活性的抑制效应，PKC的移位激活不但降低AQP4基因表达和蛋白含量，而且还对AQP4进行磷酸化修饰，导致AQP4活性降低，减轻脑水肿及神经功能损害[16]。CIR组6-12h水肿已发生，而此时AQP低表达，提示PKC可能已参与脑水肿的形成。分析其原因，可能是PKC被激活后促进兴奋性氨基酸的释放从而加重神经元的缺血性损伤，引起脑水肿。

综上所述，本研究认为在CIR早期，机体本能地调节PKC表达增加以通过磷酸化AQP4而减轻脑水肿及神经功能损害，这一点可从CIR组6 h时AQP4显著低于对照组和假手术组，而PKC明显高于对照组得到体现。随着缺血再灌注时间的加长，一方面PKC激活后兴奋性氨基酸释放加重神经元细胞的损伤，另一方面PKC不能有效减少AQP4的表达，AQP4的增多引起严重的脑水肿和神经功能的严重损害。我们由此推测，外源性PKC和PKC激活剂可减少AQP4表达从而减轻脑水肿和神经功能损害，这将为揭示颅脑损伤后细胞毒性脑水肿发病机制和颅脑损伤的防治提供重要的理论依据。PKC在CIR后期(1~5 d)是否因为调控AQP4失效而与AQP4协同加重脑水肿和神经功能损害尚需进一步研究以明确。

参考文献:

[1] Chen Y , Swanson RA SR. Astrocytes and brain injury[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23(2): 137-49.

[2] Gunnarson E, Zelenina M, Aperia A. Regulation of brain aquaporins [J]. Neuroscience, 2004, 129(4): 947-55.

[3] Tang Z, Liao Z, Shi Q, et al. Blocking p38 signal pathway lowers MMP-9 expression and reduces brain edema in rats with traumatic brain injury[J]. J South Med Univ, 2012, 32(7): 928-31.

[4] Bouzat P, Francony G, Thomas S, et al. Reduced brain edema and functional deficits after treatment of diffuse traumatic brain injury by carbamylated erythropoietin derivative[J]. Crit Care Med, 2011, 39(9): 2099-105.

[5] Lopez AB, Acaz FE, Viveros MP, et al. Changes in cannabinoid receptors,aquaporin 4 and vimentin expression after traumatic brain injury in adolescent male mice, association with edema and neurological deficit[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0128782-8.

[6] Yao XM, Derugin N, Manley GT, et al. Reduced brain edema and infarct volume in aquaporin-4 deficient mice after transient focal cerebral ischemia[J]. Neurosci Lett, 2015, 584(4): 368-72.

[7] Deng JS, Zhao F, Yu XY, et al. Expression of aquaporin 4 and breakdown of the Blood-Brain barrier after Hypoglycemia-Induced brain edema in rats[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107022-7.

[8] Rao KV, Verkman AS, Curtis KM. Aquaporin-4 deletion in mice reduces encephalopathy and brain edema in experimental acute liver failure[J]. Neurobiol Dis, 2014, 63(3): 222-8.

[9] Fazzina G, Amorini AM, Marmarou CR, et al. The protein kinase C activator phorbol myristate acetate decreases brain edema by aquaporin 4 downregulation after middle cerebral artery occlusion in the rat[J]. J Neurotrauma, 2010, 27(2): 453-61.

[10] Garcia JH, Wagner S, Liu KF, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats: Statistical validation[J]. Stroke, 1995, 26(4): 627-35.

[11] Pasantes MH, Cruz RS. Brain volume regulation: osmolytes and aquaporin perspectives[J]. Neuroscience, 2010, 168(4): 871-84.

[12] Manley GT, Binder DK, Papadopoulos MC, et al. New insights into water transport and edema in the central nervous system from phenotype analysis of aquaporin-4 null mice [J]. Neuroscience, 2004, 129(4): 983-91.

[13] Vajda Z, Pedersen M, Doczi T, et al. Studies of mdx mice [J]. Neuroscience, 2004, 129(4): 993-8.

[14]Hoshi A, Yamamoto TK. Chemical preconditioning induced reactive astrocytosis contributes to the reduction of post ischemic edema throngh aquaporin_4 downregulation[J]. Exp Neurol, 2011, 227(1): 89-95.

[15]Harada K, Maekawa T, Shama KM, et al. Translocation and down regulation of protein kinase C alpha, beta, and gamma isoforms during ischemia_reperfusion in rat brain[J]. Neurochem, 1999, 72 (6): 2556-64.

[16] 孙国柱. 水通道蛋白-4在脊髓空洞前状态的表达变化及甲基强的松龙干预作用研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2006.

(上接61页)

[2] Feng XL, Wang Y, An L, et al. Cesarean section in the People's Republic of China: current perspectives[J]. Int J Womens Health, 2014, 6(9): 59-74.

[3] 周应芳, 杨慧霞. 重视剖宫产术后子宫瘢痕妊娠的预防和处置[J]. 中华妇产科杂志, 2014, 49(1): 3-5.

[4] Litwicka K, Greco E. Caesarean scar pregnancy: a review of management options[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2011, 23(6): 415-21.

[5] 王建华, 张晟宁. 孕囊注射MTX联合中药灌肠终止剖宫产切口瘢痕妊娠疗效观察[J]. 山东医药, 2013, 53(45): 79-81.

[6] Yamaguchi M, Honda R, Uchino K, et al. Transvaginal methotrexate injection for the treatment of cesarean scar pregnancy: efficacy and subsequent fecundity[J]. J Minim Invasive Gynecol, 2014, 21(5): 877-83.

[7] Brasic N, Warden M, Vargas JE. Conservative management of cesarean scar pregnancy with sonographically guided transvaginal methotrexate injection[J]. J Ultrasound Med, 2013, 32(6): 1061-3.

[8] 田树旭, 杨隽钧, 任 彤, 等. 紫杉醇联合铂类治疗持续耐药及复发性妊娠滋养细胞肿瘤的疗效分析[J]. 实用妇产科杂志, 2014, 30(10): 764-7.

[9] Godin PA, Bassil S, Donnez J. An ectopic pregnancy developing in a previous caesarian section scar[J]. Fertil Steril, 1997, 67(2): 398-400.

[10]Mckenna DA, Poder L, Goldman M, et al. Role of sonography in the recognition, assessment, and treatment of cesarean scar ectopic pregnancies[J]. J Ultrasound Med, 2008, 27(5): 779-83.

[11]Ghezzi F, Laganà D, Franchi M, et al. Conservative treatment by chemotherapy and uterine arteries embolization of a cesarean scar pregnancy[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2002, 103(1): 88-91.

[12] Rotas MA, Haberman S, Levgur M. Cesarean scar ectopic pregnancies: etiology, diagnosis, and management [J]. Obstet Gynecol, 2006, 107(6): 1373-81.

[13] Alnazer A, Omar L, Wahba M, et al. Ectopic intramural pregnancy developing at the site of a cesarean section scar: a case report[J]. Cases J, 2009, 2(1): 9404-8.

[14] 黄骁昊, 周 雪. 双侧子宫动脉注入MTX加栓塞术联合清宫术治疗子宫切口瘢痕妊娠的临床观察[J]. 中国实用医药, 2013, 21(35): 107-8.

[15] 王怡芳. 剖宫产术后子宫瘢痕妊娠的临床诊治[J]. 中国优生与遗传杂志, 2009, 10(17): 127-8.